ПАРАЗИТОЛОГИЯ, IX, 6, 1975

УДК 576.893.192.1

АМИНОКИСЛОТНЫЙ СОСТАВ БЕЛКОВ ООЦИСТ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ КОКЦИДИЙ КУР

М. Ф. Перов и А. А. Тальдрик

Всесоюзный научно-исследовательский институт по болезням птиц, Ленинград

Исследован аминокислотный состав спор оболочек ооцист и ооцист четырех видов кокцидий кур. Установлена значительная разница в количественном составе аминокислот в ооцистах разных видов кокцидий и в отдельных структурах ооцист. На основании полученных данных рекомендуется вести целенаправленный поиск препаратов, нарушающих включение некоторых аминокислот в белковую молекулу ооцист кокцидий кур.

В процессе жизненного цикла *Eimeria* проходят ряд последовательных стадий развития, сопровождаемых сменой условий обитания, и, следовательно, сменой специфических особенностей строения и обмена веществ. В процессе макрогаметогенеза происходит интенсивная подготовка питательных и энергетических запасов к последующему существованию вне организма инцистированной зиготы — ооцисты. Образовавшаяся оболочка зиготы играет в первую очередь роль изолятора от внешней среды и тем самым обеспечивает дальнейшее развитие, исходя из внутренних запасов питательных веществ в зиготе.

Рядом исследований в области морфологии кокцидий установлена характерная общая особенность развития кокцидий — смена и изменение морфологической структуры для каждой стадии развития. Если рассматривать развитие кокцидий с точки зрения совершающихся в них процессов метаболизма, то здесь имеется ряд вопросов, о которых мы не имеем достаточно полного представления. Так, в частности, мы совершенно не располагаем сведениями о белковом составе кокцидий. Основной, по нашему мнению, причиной, определяющей отсутствие сведений о биохимическом и, в частности, аминокислотном составе ооцист кокцидий является практическая сложность в получении достаточно большого количества ооцист кокцидий, необходимого для проведения химических анализов. К настоящему времени нами впервые в отечественной практике выделены в чистом виде кокцидии кур нескольких видов, разработан и успешно применяется метод получения и очистки ооцист кокцидий в больших количествах. Это позволило нам перейти непосредственно к разработке интересующих нас вопросов. На первом этапе наших исследований мы решили определить, имеются ли различия в количественном и качественном отношении в аминокислотном составе ооцист разных видов кокцидий кур.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Необходимое для исследований количество ооцист кокцидий, свободных от посторонних примесей, было получено по методике, разработанной в лаборатории протозоологии ВНИИБП.

Цыплят русской белой породы выращивали до двухнедельного возраста в строго контролируемых условиях, исключающих спонтанное заражение их кокцидиями. Экспериментальное заражение цыплят осуществляли путем введения в зоб каждого цыпленка кокцидий в дозе от 2000 до 3000 спорулированных ооцист требуемого вида кокцидий. Помет от зараженных цыплят брали за первые трое суток латентного периода, т. е. в дни максимального выделения ооцист кокцидий.

Для извлечения ооцист из помета экспериментально зараженных цыплят и очистки их от посторонних примесей были использованы центрифуга ЦЛС-3 и бытовой сепаратор «Сатурн-2». В принципе метод получения ооцист кокцидий в большом количестве с помощью центрифуги и сепаратора основан на флотации ооцист в градиенте плотности насыщенного раствора поваренной соли и последующего их осаждения в жидкости, близкой по плотности к воде при определенной центробежной силе.

Тщательно измельченный помет центрифугировали в растворе хлористого натрия с удельным весом 1.130 в течение 5 минут при 1000 об./мин. Осадок отбрасывали, центрифугат собирали и дальнейшую работу вели на сепараторе «Сатурн-2».

Для работы на сепараторе использовали корпус, крышку барабана и фиксатор промежуточных тарелок, крепящийся сверху с помощью резинового кольца. Флотат заливали в молокоприемник, через 1—2 минуты после запуска двигателя полностью открывали пробковый кран. Для лучшей очистки ооцист от помета центрифугат пропускали через сепаратор два-три раза, центрифугат собирали, осадок отбрасывали. Затем центрифугат разводили водой 1 : 10 (плотность 1.01—1.02). Разбавленный центрифугат пропускали через барабан сепаратора при наполовину открытом пробковом кране. При такой скорости подачи жидкости ооцисты кокцидий хорошо оседают в барабане. В этом случае при сборке барабана сепаратора дополнительно ставили верхнюю тарелку на корпус барабана, что способствовало более полному осаждению ооцист кокцидий. Осадок собирали, центрифугат отбрасывали.

Собранный осадок разбавляли в одном литре воды и смешивали с двумя объемами насыщенного раствора хлористого натрия (плотность смеси 1.130) и пропускали через сепаратор. Осадок отбрасывали, центрифугат собирали, вновь разводили водой 1 : 10 и сепарировали, как было указано выше. Полученный осадок (ооцисты) собирали и проверяли их чистоту под микроскопом. В случае обнаружения примесей в ооцистах цикл очистки (флотацию и осаждение) повторяли. Для разведений флотата следует пользоваться дистиллированной водой, не содержащей механических примесей. Собранные ооцисты помещали в дистиллированную воду и осаждали на центрифуге при 500 об./мин. в течение 5 минут.

Приведенная схема получения ооцист кокцидий позволяет извлекать из помета кур от 60 до 80% ооцист, т. е. в три-четыре раза больше, чем посредством сбора их металлической петлей при одновременном сокращении времени на получение одного и того же количества ооцист в 10—15 раз.

Споруляцию ооцист осуществляли в водной среде с обильной аэрацией при температуре 20—23°. Для этой цели использовали большие делительные воронки с постоянной подачей воздуха от водоструйного лабораторного насоса. Созревшие ооцисты обрабатывали антибиотиками (пенициллин, стрептомицин, нистатин) в течение 30 мин. при 37°, после чего промывали дистиллированной водой на стеклянном пористом фильтре № 2. Таким способом достигалась очистка кокцидий от микрофлоры и посторонних примесей.

В качестве материала для изучения аминокислотного состава белков использовали споры, оболочки ооцист и ооцисты следующих видов кокцидий: *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox*. Для получения спор и оболочек ооцист, ооцисты кокцидий помещали в фосфатнобуферный раствор при нейтральной pH и разрушали на магнитной мешалке с бусами. Разделение разрушенных ооцист на две фракции — оболочки ооцист и споры — производили с помощью дифференциального центрифугирования. Степень разделения и однородность состава фракцией легко контролируется визуально под обычным световым микроскопом, что позволяет получать фракции абсолютно однородные по составу (споры или оболочки ооцист).

Гидролиз белков спор, оболочек и ооцист кокцидий осуществляли в 6 н. HCl при 105° в течение 24 часов. Аминокислотный состав определяли на автоматическом аминокислотном анализаторе марки Hd 1200 E при четырехчасовом цикле.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Данные по аминокислотному составу ооцист, спор и оболочек приведены в табл. 1, 2 и 3. Качественный состав белков ооцист *E. tenella*, *E. brunetti*, *E. mitis*, *E. praecox* в основном идентичен. В молекулах белков *E. mitis* и *E. tenella* отсутствует цистин. В количественном отношении наблюда-

Таблица 1

Аминокислотный состав ооцист кокцидий (в %)

Аминокислоты	Вид кокцидий		
	E. tenella	*E. brunetti*	*E. mitis*
Лизин	5.25	11.15	8.12
Гистидин	5.57	10.70	7.27
Аргинин	4.28	14.39	8.09
Аспарагиновая кислота	9.75	4.61	6.65
Треонин	4.11	3.67	4.33
Серин	4.30	4.75	5.94
Глутаминовая кислота	15.85	9.56	11.69
Пролин	24.09	7.65	9.40
Глицин	2.69	5.33	4.70
Аланин	3.98	5.23	5.13
Цистин	0	1.89	0
Валин	6.23	5.21	5.69
Метионин	0.11	0.60	2.23
Изолейцин	0.18	3.28	4.42
Лейцин	3.88	6.49	6.47
Тирозин	3.15	2.31	5.72
Фенилаланин	3.25	3.10	4.16

Таблица 2

Аминокислотный состав спор кокцидий (в %)

Аминокислоты	Вид кокцидий			
	E. tenella	*E. brunetti*	*E. mitis*	*E. praecox*
Лизин	5.79	1.90	7.42	1.99
Гистидин	7.75	2.17	3.71	2.81
Аргинин	6.28	5.43	6.92	4.48
Аспарагиновая кислота	3.48	8.10	10.24	7.56
Треонин	2.97	2.01	4.13	5.82
Серин	1.82	Следы	4.53	6.30
Глутаминовая кислота	13.70	18.37	16.05	20.72
Пролин	29.97	3.31	6.41	5.42
Глицин	3.27	11.20	6.89	9.55
Аланин	4.90	21.75	7.14	6.87
Цистин	0	Следы	0	5.54
Валин	5.01	14.02	7.27	5.67
Метионин	1.41	Следы	Следы	Следы
Изолейцин	3.30	6.63	4.99	5.62
Лейцин	4.71	1.41	8.68	8.32
Тирозин	2.54	2.55	Следы	Следы
Фенилаланин	3.10	0.87	5.53	1.93

Таблица 3

Аминокислотный состав оболочек ооцист какцидий (в %)

Аминокислоты	Вид кокцидий			
	E. tenella	*E. brunetti*	*E. mitis*	*E. praecox*
Лизин	3.92	3.81	6.72	3.35
Гистидин	10.19	8.51	8.76	10.81
Аргинин	2.74	5.66	5.66	5.79
Аспарагиновая кислота	3.08	4.86	7.93	6.58
Треонин	1.38	4.41	5.34	8.01
Серин	14.56	3.55	4.54	9.37
Глутаминовая кислота	8.09	15.82	15.78	16.39
Пролин	37.71	9.30	11.20	8.21
Глицин	2.25	8.42	4.52	6.75
Аланин	2.77	6.22	4.99	4.91
Цистин	0	4.82	0	3.69
Валин	3.48	6.10	5.27	3.20
Метионин	0.81	0.37	1.24	1.78
Изолейцин	3.11	7.82	3.72	4.07
Лейцин	2.15	6.81	4.44	2.59
Тирозин	2.05	2.66	5.97	Следы
Фенилаланин	2.13	0.75	3.91	4.08

ются существенные различия в содержании аминокислот у исследованных видов кокцидий. Эти же различия наблюдаются и в белках ооцист, спор и оболочек ооцист (табл. 2 и 3).

Сумма дикарбоновых аминокислот, которые в обменных процессах играют весьма важную роль, у данных видов кокцидий варьирует в широких пределах (от 19 до 33%), в спорах — от 60 до 77, в оболочках ооцист от 14 до 29%.

Глутаминовая и аспарагиновая аминокислоты, аланин и аминокислоты, связанные с ними прямым переходом в обмене (валин, лейцин, метионин, пролин, аргинин, гистидин), в ооцистах кокцидий содержатся в пределах 62—74%, в спорах — 60—77, в оболочках ооцист — 60—71%.

Незаменимые аминокислоты в ооцистах кокцидий составляют от 32 до 59% белковой молекулы, содержание их в спороцистах находится в пределах 34—49%, а в оболочках ооцист — 29—45%.

Полученные данные не позволяют пока сделать какие-либо широкие обобщения. Однако, сопоставляя аминокислотный состав отдельных видов кокцидий между собой, можно сделать вывод, что белкам различных видов кокцидий в экзогенной стадии развития свойствен определенный аминокислотный состав, т. е. существуют генетически обусловленные межвидовые различия по количественному содержанию аминокислот.

Мы полагаем, что незаменимые аминокислоты в кокцидиях, так же как и в организме хозяина, не синтезируются, но в процессе метаболизма они играют основную роль. По нашему мнению, с практической точки зрения представляют интерес незаменимые аминокислоты метионин, фенилаланин и треонин. В спороцистах они содержатся в незначительных количествах, а их физиологическое значение в обмене веществ неоспоримо. Учитывая, что метионин является основным донором метильных групп в организме, которые используются для метилирования не только различных метаболитов, но и некоторых поступающих в организм вредных веществ, целесообразно было бы синтезировать препараты, имеющие большое сходство с природным метионином, способные заменить эту аминокислоту в цепи реакций обмена и, включаясь в различные соединения, вытеснить ее из них. Это привело бы к нарушению необходимого соотношения естественных аминокислот и к отрицательному воздействию на азотистый обмен в организме паразита.

Фенилаланин в процессе обмена веществ в организме не образуется, но имеет существенное физиологическое значение. Поэтому целесообразно синтезировать препараты, которые вытеснили бы или заменили фенилаланин в белковой молекуле.

Треонин используется не только в белковом обмене, но и при синтезе холестерина, жирных кислот и углеводов, следовательно, поиск веществ, нарушающих обмен треонина, должен быть результативным.

Таким образом, мы считаем весьма перспективным синтез кокцидиостатических препаратов, нарушающих включение перечисленных незаменимых аминокислот в белковую молекулу кокцидий.

ВЫВОДЫ

1. Установлены межвидовые различия в количественном и качественном содержании аминокислот в белках ооцист кокцидий кур.
2. В белках ооцист *E. tenella* и *E. mitis* цистин отсутствует.

AMINO ACIDS OF PROTEINS OF OOCYSTS IN SOME SPECIES OF COCCIDIA FROM HENS

M. F. Perov and A. A. Taldrik

SUMMARY

The composition of amino acids of sporocysts, membranes of oocysts and oocysts of four species of *Coccidia* from hens is reported. A considerable figgerence was found to exist in the quantitative composition of amino acids in oocysts of different *Coccidia* species and in different structures of oocysts.

It is necessary to carry out a search of preparations breaking the inclusions of some amino acids into the protein molecule of oocysts of *Coccidia* from hens.